

## Zastosowanie perfluorozwiązków do ekstrakcji metabolitów roślinnych

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie perfluorozwiązków do ekstrakcji *in situ* roślinnych metabolitów i ich pochodnych z hodowli biomasy roślinnej prowadzonej w warunkach *in vitro*.

Ekstrakcja *in situ* stosowana jest w celu usuwania nagromadzonego w medium hodowlanym produktu (lub produktów) metabolizmu komórek. Bezpośrednie usuwanie metabolitów w trakcie prowadzenia hodowli wymaga zastosowania jako ekstrahentów inertnych związków chemicznych, które nie powodują zmian patologicznych w fizjologii oraz morfologii hodowanych komórek, tkanek, organów roślinnych czy też całych roślin. Znane są techniki ekstrakcji *in situ* pozwalające na odbiór metabolitów z hodowli roślinnych prowadzonych w warunkach *in vitro* wykorzystujące jako ekstrahenty: *n*-heksadekan, frakcje ciekłej parafiny (tzw. lekką i ciężką parafinę), jak i techniki adsorpcji *in situ* wykorzystujące do tego celu żywice XAD<sup>TM</sup>.

I tak na przykład w publikacji Prakash, G., & Srivastava, A. K. (2011). (Integrated yield and productivity enhancement strategy for biotechnological production of Azadirachtin by suspension culture of *Azadirachta indica*. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, (6), 129–137) zaproponowano ekstrakcję *in situ* azadirachtyny heksadekanem użytym w ilości od 2 do 5% objętości medium hodowlanego, co wpłynęło pozytywnie na zewnątrzkomórkowe wydzielanie azadirachtyny bez hamowania szybkości wzrostu komórek. Łączne zastosowanie heksadekanu i surfaktantu Pluronic F-68 pozwoliło na zwiększenie stopnia ekstrakcji, w wyniku czego osiągnięto 2-krotny wzrost wydajności wytwarzania antrachinonów (Bassetti & Tramper, (1995). Increased anthraquinone production by *Morinda citrifolia* in a two-phase system with Pluronic F-68. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 353–358.). Z kolei w kulturze zawiesinowej *Lithospermum erythrorhizon* (*Boraginaceae* – szorstkolistne) zastosowano elicytor grzybowy oraz ekstrakcję *in situ* *n*-heksadekanem. W rezultacie uzyskano 24-krotne zwiększenie wydajności wytwarzania szikoniny (Kim & Chang, (1990). *Lithospermum erythrorhizon*, 12(6), 443–446). Heksadekan był także stosowany do ekstrakcji *in situ* podczas hodowli zawiesiny komórek *Arnebia euchroma* (*Boraginaceae* – szorstkolistne) w połączeniu z elicytorem grzybowym. Uzyskano ponad 6-krotnie zwiększoną wydajność wytwarzania szikoniny (Fu, X.-Q. & Lu, D.-W. (1999). Stimulation of shikonin production by combined fungal elicitation and *in situ* extraction in suspension cultures of

*Arnebia euchroma*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(5-6), 243–246. doi:10.1016/S0141-0229(98)00104-5). W hodowli zawiesinowej *Arnebia euchroma* stosowano także ekstrakcję *in situ* parafiną lekką i ciężką wraz z manipulacją składem pożywki, dzięki czemu uzyskano ponad 72% i 49% zwiększone wytwarzanie szikoniny przy zastosowaniu odpowiednio ciężkiej i lekkiej parafiny przy zahamowaniu przyrostu biomasy (Kumar, R., Sharma, N., Malik, S., Bhushan, S. & Sharma, U. K. (2011). Cell suspension culture of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston – a potential source of naphthoquinone pigments. *Journal of Medicinal Plants*, 5(25), 6048–6054).

Do ekstrakcji *in situ* w hodowlach zawiesinowych *Taxus chinensis* (*Taxaceae* – cisowate) stosowano ester dibutyłowy kwasu ftalowego, kwas oleinowy, terpineol (Zhang, C. & Xu, H. (2001). Improved paclitaxel production by *in situ* extraction and elicitation in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters*, 23, 189–193), a w przypadku hodowli zawiesiny komórek *Taxus baccata*: alkohol lauryłowy, oktadekan lub trikaprylin (Yamamoto, S., Ogawa, K., Hayashi, S. & Furasaki, S. (2007). Effect of increased volume fraction of organic solvents on callus growth and taxol production in simultaneous suspension callus culture of *Taxus baccata* and *in situ* extraction. *Solvent Extraction Research and Development, Japan*, 14, 71–77).

Związki organiczne dotychczas stosowane do ekstrakcji *in situ* metabolitów wtórnych w roślinnych hodowlach *in vitro* wykazują jednak pewne działanie toksyczne na komórki roślinne oraz nie wpływają na przyspieszenie przyrostu biomasy w wystarczającym stopniu, co prowadzi do zmniejszenia wydajności tych hodowli. Również same metabolity wtórne gromadzące się w podłożu hodowlanym często działają toksycznie na komórki roślinne, stąd ich jednoczesne z wytwarzaniem metabolitu usuwanie z układu hodowlanego jest korzystne dla produktywności hodowli komórkowych, np. gromadzący się w podłożu paklitaksel wywoływał apoptozę komórek w zawieszynie *T. cuspidata* (Kim et al., 2005). Istnieje zatem nieustająca potrzeba poszukiwania nowych, bardziej korzystnych związków przydatnych dla ekstrakcji metabolitów.

Z przedstawionego stanu techniki wynika, że do ekstrakcji *in situ* roślinnych metabolitów wtórnych i ich pochodnych z hodowli roślinnego materiału biologicznego prowadzonej w warunkach *in vitro* nie były dotychczas stosowane ciekłe perfluorowane pochodne węglowodorów (synonimy: perfluorozwiązki, perfluorowęglowodory, perfluoroalkany,; ang. *perfluorochemicals*, *perfluorocarbons*; PFC).

Ciekłe perfluorozwiązki to syntetyczne pochodne alifatycznych lub cyklicznych węglowodorów, w których większość lub wszystkie atomy wodoru zostały zastąpione

podstawnikami fluorkowymi. Wysycenie szkieletu węglowego podstawnikami fluorkowymi skutkuje szeregiem znaczących zmian w strukturze chemicznej oraz własnościach fizykochemicznych perfluorozwiązków w porównaniu do ich węglowodorowych analogów. Unikalne właściwości perfluorozwiązków są powodem zwiększającego się zainteresowania naukowego tą grupą związków organicznych, które obejmuje różne dziedziny nauk biomedycznych, bioinżynierskich i biotechnologicznych (Lowe C. K. (2002) Perfluorochemical respiratory gas carriers: benefits to cell culture systems. *Journal of Fluorine Chemistry*, 118, 19-26.; Pilarek M. & Szewczyk K. W. (2005).

Ciekłe perfluorozwiązki charakteryzują się około 1,8-2,0-krotnie wyższą gęstością w odniesieniu zarówno do wody, jak i do ich węglowodorowych analogów, z których zostały zsyntetyzowane. Wykazują jednoczesną hydro- i lipofobowość. Powoduje to, że w układach wielofazowych perfluorozwiązki nie mieszają się z wodą, ani z fazą organiczną, tworząc osobną fazę zwaną fazą perfluorowaną. Tym samym ciekłe perfluorozwiązki nie wykazują mieszalności z mediami hodowlanymi i pożywkami. Kolejną cechą perfluorozwiązków jest ich wysoka stabilność termiczna, chemiczna i biologiczna. Cecha ta wynika z większej energii wiązania węgiel-fluor niż analogicznego wiązania węgiel-wodór występującego w węglowodorach. Inertność biologiczna i chemiczna wynika również ze sztywności łańcucha węglowego, który w perfluorozwiązkach otoczony jest chmurą elektronową pochodzącą od podstawników fluorkowych. Inne charakterystyczne cechy perfluoropochodnych to niska lepkość, słabe oddziaływania międzycząsteczkowe oraz niskie temperatury wrzenia i topnienia. Z inżynierskiego punktu widzenia, szczególnie interesującą własnością ciekłych perfluorozwiązków jest wysoka rozpuszczalność gazów (w tym gazów oddechowych, czyli O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>), dzięki czemu mogą one być wykorzystywane jako wydajne ciekłe nośniki gazów (Lowe, 2002). Rozpuszczalność tlenu w PFC jest około 20-krotnie wyższa niż w wodzie i nie zależy od temperatury. Liczne prace doświadczalne oraz badania kliniczne potwierdzają brak toksycznego wpływu PFC na żywe komórki (Lowe, 2002; Pilarek M. & Szewczyk K. W. (2008) Effects of perfluorinated oxygen carrier application in yeast, fungi and plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 41, 38-42.; Riess JG (2006) Perfluorocarbon-based oxygen delivery. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*. 34, 2006, 567–580.; M. Pilarek, J. Glazyryna, P. Neubauer, Enhanced growth and recombinant protein production of *Escherichia coli* by a perfluorinated oxygen carrier in miniaturized fed-batch cultures, *Microb. Cell Fact.* 10 (2011) 50; Pilarek M., Brand E., Hillig F., Krause M., Neubauer P. Enhanced plasmid production in miniaturized high-cell-density cultures of *Escherichia coli* supported with perfluorinated oxygen carrier. *Bioprocess and*

*Biosystems Engineering*. 2012). Przykładami ciekłych perfluorozwiązków stosowanych w biotechnologii roślin są: perfluorodekalina, perfluorotributyloamina, perfluoro-N-metyloizochinolina, perfluoro-N-cykloheksylopiperydyna, 1-bromo-perfluorooktan (Perflubron<sup>®</sup>), bis(perfluorobutylo)eten.

Typową bioprosesową i biotechnologiczną aplikacją ciekłych perfluorozwiązków jest ich wykorzystanie do intensyfikacji transportu gazów oddechowych w układach hodowli komórek prowadzonych w warunkach *in vitro*. Zastosowanie ciekłych perfluorozwiązków jest metodą alternatywną wobec tradycyjnych metod barbotażowego napowietrzania hodowli węglonych fazą gazową. Większe nasycenie tlenem medium hodowlanego skutkuje intensywnym przyrostem biomasy oraz zwiększoną produkcją określonych metabolitów komórkowych (Pilarek & Szewczyk, 2005). Nasycone tlenem perfluorozwiązki wykorzystano m. in. do natleniania hodowli węglonych komórek roślinnych, tkanki kalusowej, hodowli protoplastów roślinnych, kultur korzeni włóśnikowych.

Zgodnie z wynalazkiem ciekłe perfluorozwiązki stosuje się w charakterze medium do ekstrakcji.

Istotą wynalazku jest zastosowanie ciekłych perfluorowanych pochodnych węglowodorów jako medium do ekstrakcji *in situ* roślinnych metabolitów wtórnych i ich pochodnych w układach hodowli *in vitro* materiału biologicznego pochodzenia roślinnego.

Korzystnie stosuje się perfluorozwiązki wybrane spośród: perfluorodekaliny, perfluorotributyloaminy, perfluoro-N-metyloizochinoliny, perfluoro-N-cykloheksylopiperydyny, 1-bromo-perfluorooktanu, bis(perfluorobutylo)etenu.

Perfluorozwiązki w zastosowaniu według wynalazku stosuje się korzystnie w ilościach od 20% do 60% v/v medium hodowlane/perfluorozwiązek.

Perfluorozwiązki korzystnie stosuje się do ekstrakcji *in situ* w hodowli zawiesinowej komórek *Arnebia euchroma*; komórek, tkanek i organów różnych gatunków z rodzaju *Taxus* (w tym paklitakselu); do ekstrakcji *in situ* metabolitów takich jak katarantyna, ajmalicyna, johimbina i serpentyna w hodowli korzeni transgenicznych oraz hodowli zawiesinowej komórek barwinka różowego (*Catharanthus roseus*); do ekstrakcji *in situ* szikoniny i jej pochodnych w hodowli zawiesinowej *Arnebia euchroma*, *Lithospermum canescens*; do ekstrakcji *in situ* kampotecyny i jej pochodnych w hodowli zawiesinowej *Camptotheca acuminata*.

Ciekłe perfluorozwiązki korzystnie dodaje się do układu hodowlanego na początku hodowli i następnie prowadzi się hodowlę znanymi metodami. Możliwe jest także dodanie perfluorozwiązku w dowolnym momencie trwania hodowli.

Ciekły perfluorozwiązek przed dodaniem do układu hodowlanego korzystnie poddaje się sterylizacji dowolną metodą, np. metodą termiczną w autoklawie albo na drodze filtracji.

Perfluorozwiązek można stosować w formie czystej lub w formie nasyconej gazem, takim jak powietrze, tlen, CO<sub>2</sub>, etylen lub ich mieszaniny. Nasylenie perfluorozwiązków gazami oddechowymi (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> lub ich mieszaniną) pozwala na wzbogacenie atmosfery gazowej w naczyniach hodowlanych, co przekłada się na wyższe wskaźniki przyrostów i biomasy oraz zwiększoną morfogenezę (Bach A., Rakoczy-Trojanowska M. (2009). Czynniki wpływające na efektywność regeneracji *in vitro*. W: Biotechnologia Roślin. Praca zbiorowa pod red. S. Malepszego, PWN, Warszawa). Zastosowanie etylenu w przydatku wytwarzania metabolitów wtórnych w hodowlach *in vitro*, np. szikoniny (Touno et al., 2005) i paklitakselu (Mirjalili N., Linden J. (1996), Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models. Biotechnology Progress, 12: 110-118.) wpływa korzystnie na wzrost wydajności tych hodowli.

Wyższa od wody gęstość perfluorozwiązków oraz ich hydrofobowość sprawia, że wprowadzone do układu hodowlanego, który stanowi wodna faza pożywki z biomasą danego typu, tworzą osobną fazę (fazę perfluorowaną) na dnie naczynia hodowlanego. Komórki pozostają w fazie medium hodowlanego i nie przechodzą do fazy perfluorowanej, w której znajduje się rozpuszczony metabolit. Układ dwufazowy umożliwia szybki rozdział obu faz, a rozdzielone fazy mogą następnie być wykorzystywane w niezależny sposób. Metabolit może być wydzielony, np. z wykorzystaniem rozpuszczalnika o większym powinowactwie do metabolitu niż PFC. Perfluorozwiązek, po usunięciu metabolitu, może być ponownie użyty w hodowli, co stwarza możliwość prowadzenia hodowli w trybie ciągłym w sytuacji, gdy wydzielany przez hodowane komórki roślinne metabolit jest toksyczny. Można także prowadzić recyrkulację medium hodowlanego. Powstaje również możliwość użycia toksycznych rozpuszczalników do usuwania metabolitów z fazy perfluorowanej, ponieważ nie mają one bezpośredniego kontaktu z układem hodowlanym. Oczyszczony ciekły perfluorozwiązek może być ponownie wykorzystywany, a toksyczne metabolity lub toksyczne rozpuszczalniki nie zatrują hodowli.

Inertne biologicznie perfluorozwiązki nie mają żadnego negatywnego wpływu na komórki hodowanej biomasy roślinnej. Zważywszy że składniki medium hodowlanego nie rozpuszczają się w perfluorozwiązkach, ich dodatek do układu hodowlanego nie wpływa na ilościowy skład medium hodowlanego. Usytuowanie fazy perfluorowanej na dnie naczynia hodowlanego nie ogranicza wymiany masy pomiędzy pożywką a fazą gazową obecną w naczyniu hodowlanym nad pożywką. PFC są stabilne w pełnym zakresie temperatur

wykorzystywanych w hodowlach *in vitro* roślinnego materiału biologicznego. Wysoka lotność PFC ułatwia późniejszą analizę fazy perfluorowanej zawierającej metabolit, np. metodą chromatografii gazowej. Zaobserwowano również, że ekstrakcja *in situ* metabolitów ze środowiska hodowli ma pozytywny wpływ na przyrost biomasy hodowanych komórek, tkanek i organów oraz wydajność biosyntezy wartościowych komercyjnie metabolitów, takich jak szikonina/alkanina czy paklitaksel.

Wynalazek został bliżej przedstawiony w przykładach.

Na Fig. 1 rysunku przedstawiono wyniki pomiarów zawartości pochodnych szikoniny (szikonina/alkanina) uzyskanych w próbach pochodzących z układu hodowlanego z ekstrakcją *in situ* perfluorodekaliną zgodnie z Przykładem 1 oraz z układu kontrolnego (bez dodatku PFC).

Na Fig. 2 rysunku przedstawiono wyniki pomiarów zawartości paklitakselu w korzeniach uzyskanych w próbach pochodzących z układu hodowlanego z ekstrakcją *in situ* perfluorodekaliną zgodnie z Przykładem 2 oraz z układu kontrolnego (bez dodatku PFC).

Na Fig. 3 rysunku przedstawiono wyniki pomiarów zawartości kwasów fenolowych uzyskanych w próbach pochodzących z układu hodowlanego z ekstrakcją *in situ* perfluooktanem zgodnie z Przykładem 3 oraz z układu kontrolnego (bez dodatku PFO).

Na Fig. 4 rysunku przedstawiono wyniki pomiarów zawartości alkaloidów indolowych uzyskanych w próbach pochodzących z układu hodowlanego z ekstrakcją *in situ* perfluorotributyloaminą zgodnie z Przykładem 4 oraz z układu kontrolnego (bez dodatku PFTBA). Zawartość alkaloidów badana była po 6 pasażu.

Przykład 1.

Do kolb Erlenmeyera o pojemności 250 mL zaopatrzonych w wewnętrzne przegrody intensyfikujące mieszanie medium hodowlanego, dodano po 50 mL pożywki MSA (Davydenkov V.N., Patudin A.V., Popov Y.G., Rabinovitch S.A., Miroshnikov A.I. (1991) Cell culture of *Arneubia euchroma* (Royale) Johnst. – novel source of shikonin production. Him. Farm. Zh. tom 1, 53-55; Sykłowska-Baranek K., Pietrosiuk A., Naliwajski M., Kawiak A., Jeziorek M., Wyderska S., Łojkowska E., Chinou I. (2012) Effect of L-phenylalaninie on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arneubia euchroma* (Royale) Johnst. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plants 5, tom 48, 555-564) oraz po 20 mL jałowej perfluorodekalinie. Po dodaniu do układu hodowlanego, perfluorozwiązki nie mieszały się z ciekłą pożywką tworząc na dnie naczynia odrębną warstwę perfluorowaną. Hodowlę kontrolną stanowił układ pozbawiony dodatku fazy perfluorowanej. Układ hodowlany inokulowano 1,50 g świeżej masy wyselekcjonowanych

komórek *Arnebia euchroma* (Royale) Johnst. uzyskanych z 28 dnia hodowli zawieszinowej. Naczynia hodowlane umieszczano na wstrząsarce rotacyjnej Infors AG TR-205. Proces hodowli prowadzono przez 28 dni, w fitotronie (temperatura 25°C), w ciemności, przy zachowaniu stałej liczby obrotów wstrząsarki (100 rpm). W celu ilościowego określenia przyrostu biomasy oraz stężenia szikoniny w medium hodowlanym oraz w hodowanej biomacie, co 7 dni analizowano trzy losowo wybrane kolby zawierające układy hodowlane.

Otrzymaną po rozdzieleniu faz perfluorodekalinę zawierającą pochodne szikoniny poddawano ekstrakcji metanolem. Proces powtarzano dwukrotnie, stosując na każde 20 mL fazy perfluorowanej 100 ml (I etap regeneracji PFC), a następnie 50 ml (II etap regeneracji PFC) metanolu. Przed ponownym użyciem, perfluorodekalinę 3-krotnie płukano wodą destylowaną w celu usunięcia pozostałości metanolu.

Uzyskane ekstrakty metanolowe przesączano na sączku karbowanym a następnie odparowywano w  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  na wyparce próżniowej, do uzyskania stałej masy. Suchą pozostałość rozpuszczano w 500 mikroL metanolu, a następnie analizowano techniką HPLC, połączoną z analizą widma UV, w celu ilościowego określenia zawartości szikoniny i jej pochodnych (alkaniny, acetyloszikoniny, izobutyryloszikoniny).

Porównanie zawartości pochodnych szikoniny uzyskanych zgodnie z przykładem oraz w układzie kontrolnym (bez PFD) przedstawiono na Fig. 1

Przykład 2.

Do kolb Erlenmayera o pojemności 250 mL dodawano po 35 mL pożywki DCR-M (Gupta P. K., Durzan D. J. (1985) Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and Sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports, 4: 177-179 w modyfikacji Sykłowska-Baranek K., Pietrosiuk A., Kokoszka A., Furmanowa M. (2009) Enhancement of taxane production in hairy root culture of *Taxus x media* var. *Hicksii*. Journal of Plant Physiology, 166: 1950–1954) oraz po 20 mL jałowej perfluorodekalinie. Po dodaniu do układu hodowlanego, perfluorozwiązki nie mieszały się z ciekłą pożywką tworząc na dnie naczynia odrębną warstwę perfluorowaną. Hodowlę kontrolną stanowił układ pozbawiony dodatku fazy perfluorowanej. Układ hodowlany inokulowano 0,7 g świeżej masy wyselekcjonowanych korzeni transgenicznych *Taxus x media* var. *Hicksii* uzyskanych z 28 dnia hodowli. W celu zwiększenia wytwarzania paklitakselu do hodowli dodawano prekursor L-fenylalaninę (100  $\mu\text{M}$ ) i elicytor – koronatyne (10  $\mu\text{M}$ ). Naczynia hodowlane umieszczano na wstrząsarce rotacyjnej Infors AG TR-205. Proces hodowli prowadzono w fitotronie (temperatura 25°C), w ciemności, przy zachowaniu stałej liczby obrotów wstrząsarki (105 rpm). W celu ilościowego określenia przyrostu biomasy oraz zawartości

paklitakselu w medium hodowlanym oraz w hodowanej biomacie, analizowano trzy losowo wybrane kolby zawierające układy hodowlane po 7 i 14 dniach trwania hodowli.

Otrzymaną po rozdzieleniu faz perfluorodekalinę zawierającą paklitaksel poddawano ekstrakcji metanolem. Proces powtarzano dwukrotnie, stosując na każde 20 mL fazy perfluorowanej 100 mL (I etap regeneracji PFC), a następnie 50 ml (II etap regeneracji PFC) metanolu. Przed ponownym użyciem, perfluorodekalinę 3-krotnie płukano wodą destylowaną w celu usunięcia pozostałości metanolu.

Uzyskane ekstrakty metanolowe odparowywano w  $40 \pm 1$  °C na wyparce próżniowej do uzyskania stałej masy. Suchą pozostałość rozpuszczano w 300 mikroL metanolu a następnie analizowano techniką HPLC połączonej z analizą widma UV w celu ilościowego określenia zawartości paklitakselu i innych taksanów.

Porównanie zawartości paklitakselu uzyskanych w układzie hodowlanym z perfluorodekaliną zgodnie z przykładem oraz w układzie kontrolnym (bez PDF) przedstawiono na Fig. 2.

Przykład 3.

W pędach, korzeniach naturalnych oraz transgenicznych gatunku *Rindera graeca* (Boraginaceae) poszukiwano następujących kwasów fenolowych: kwasu rozmarynowego, kwasu litospermowego oraz kwasu litospermowego B.

Materiał roślinny hodowano w kolbach Erlenmeyera o pojemności 250 mL zawierających po 50 mL pożywki DCR-M (Gupta P. K., Durzan D. J. (1985) Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and Sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports, 4: 177-179 oraz po 20 mL jałowego perfluorooktanu (PFO). Hodowlę kontrolną stanowił układ pozbawiony dodatku fazy perfluorowanej. Układ hodowlany inokulowano 0,5 g świeżej masy pędów lub korzeni.

Naczynia hodowlane zawierające korzenie umieszczano na wstrząsarce rotacyjnej Infors AG TR-205. Proces hodowli prowadzono przez 28 dni, w fitotronie (temperatura 25°C), w ciemności przy zachowaniu stałej liczby obrotów wstrząsarki (105 rpm). Przyrost biomasy oraz zawartość kwasów fenolowych w medium hodowlanym oraz w hodowanej biomacie określano na koniec okresu hodowlanego. Natomiast hodowlę pędów prowadzono w fitotronie (temperatura 25°C), na świetle 12h/12h dzień/noc.

Otrzymany po rozdzieleniu faz perfluorooktan zawierający kwasy fenolowe poddawano ekstrakcji metanolem. Proces powtarzano dwukrotnie, stosując na każde 20 mL fazy perfluorowanej 100 ml. Przed ponownym użyciem, perfluorooktan 3-krotnie płukano wodą destylowaną w celu usunięcia pozostałości metanolu.

Uzyskane ekstrakty metanolowe odparowywano w  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  na wyparce próżniowej do uzyskania stałej masy.

Zliofilizowane pędy, korzenie naturalne i transgeniczne mikronizowano w moździerzu i odważano po 100 mg do 2 ml probówek typu Eppendorf. Do każdej próbki umieszczonej w probówce typu Eppendorf dodawano 1 ml metanolu i ekstrahowano w łaźni ultradźwiękowej Sonorex przez 30 min. Po tym czasie próbki przenoszono na wytrząsarkę INFORS HT TR-250 i wytrząsano z prędkością 105 rpm, w ciemności w temp.  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  przez 12 h. Po zdjęciu z wytrząsarki próbki wirowano w temp.  $+4^\circ\text{C}$ , przy 18000 rpm w wirówce typu EBA 12 R przez 15 min. Po odwirowaniu roztwory z nad osadów przenoszono do nowych 2 ml probówek typu Eppendorf. Pozostały materiał roślinny ekstrahowano powtórnie 1 ml MEOH w łaźni ultradźwiękowej przez 30 min. Po ekstrakcji próbki wirowano w warunkach opisanych powyżej. Supernatanty łączono i odparowywano w urządzeniu Cooling Trap (Typ: VR-maxi). Pożywki pochodzące liofilizowano i poddawano ekstrakcji metanolem wg procedury opisanej wyżej.

Przygotowane próbki rozpuszczano w 1500 mikroL metanolu, a następnie analizowano techniką HPLC połączonej z analizą widma UV w celu ilościowego określenia zawartości poszukiwanych kwasów fenolowych.

Na rysunku 3 przedstawiono wyniki pomiarów zawartości kwasów fenolowych uzyskanych w próbach pochodzących z układu hodowlanego z ekstrakcją *in situ* perfluooktanem oraz z układu kontrolnego (bez dodatku PFO).

Porównanie zawartości kwasów fenolowych uzyskanych zgodnie z przykładem oraz w układzie kontrolnym (bez PFO) przedstawiono na Fig. 3

Przykład 4.

Do kolb Erlenmeyera o pojemności 300 mL dodawano po 60 mL płynnej pożywki  $\frac{1}{2}$  B5 (Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968) bez regulatorów wzrostu oraz po 20 mL jałowej perfluorotributyloaminy (PFTBA).

Po dodaniu do układu hodowlanego, perfluorozwiązki nie mieszały się z ciekłą pożywką tworząc na dnie naczynia odrębną warstwę perfluorowaną. Hodowlę kontrolną stanowił układ pozbawiony dodatku fazy perfluorowanej. Układ hodowlany inokulowano 1 g świeżej masy wyselekcjonowanych korzeni transgenicznych *Catharanthus roseus* uzyskanych z 28 dnia hodowli. Proces hodowli prowadzono w fitotronie (temperatura  $25^\circ\text{C}$ ), w ciemności przy zachowaniu stałej liczby obrotów wstrząsarki (30 rpm). Ilościowego określenia przyrostu biomasy oraz zawartości alkaloidów indolowych w medium hodowlanym oraz w hodowanej biomacie dokonywano po 28 dniach trwania hodowli.

Otrzymaną po rozdzieleniu faz perfluorotributyloaminę zawierającą alkaloidy poddawano ekstrakcji metanolem. Proces powtarzano dwukrotnie, stosując na każde 20 mL fazy perfluorowanej 100 ml metanolu. Przed ponownym użyciem, perfluorotributyloaminę 3-krotnie płukano wodą destylowaną w celu usunięcia pozostałości metanolu.

Uzyskane ekstrakty metanolowe odparowywano w  $40 \pm 1$  °C na wyparce próżniowej do uzyskania stałej masy. Suchą pozostałość rozpuszczano w 1000 mikroL metanolu a następnie analizowano techniką HPLC połączonej z analizą widma UV w celu ilościowego określenia zawartości johimbiny, ajmalicyny, katarantyny i serepentyny.

Na rysunku 4 przedstawiono wyniki pomiarów zawartości alkaloidów indolowych uzyskanych w próbach pochodzących z układu hodowlanego z ekstrakcją *in situ* perfluorotributyloaminą oraz z układu kontrolnego (bez dodatku PFTBA). Zawartość alkaloidów badana była po 6 pasażu.

Porównanie zawartości alkaloidów indolowych uzyskanych zgodnie z przykładem oraz w układzie kontrolnym (bez PFTBA) przedstawiono na Fig. 4.